

# EUROPEAN PATENT OFFICE

(3)

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2003226638  
PUBLICATION DATE : 12-08-03

APPLICATION DATE : 30-01-02  
APPLICATION NUMBER : 2002022575

APPLICANT : NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY;

INVENTOR : KOJIMA SHUJI;

INT.CL. : A61K 9/127

TITLE : TARGET-TROPIC LIPOSOME

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a liposome applicable to the medical/pharmaceutical fields including pharmaceutical preparations and cosmetics, and usable as a therapeutic drug delivery system or a diagnostic cell/tissue sensing probe for locally delivering a drug or a gene to affected part(s) through recognizing a target cell/tissue such as cancer.

SOLUTION: This liposome useful as the therapeutic drug delivery system or diagnostic cell/tissue sensing probe is constructed so as to selectively control the intake of a target cell/tissue by variously altering the molecular structure of the sugar chains in a sugar-modified liposome where the sugar chains are bound via linker proteins to the corresponding liposome.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-226638

(P2003-226638A)

(43) 公開日 平成15年8月12日 (2003.8.12)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

A 61 K 9/127

識別記号

F I

A 61 K 9/127

テ-マコード(参考)

4 C 0 7 6

審査請求 未請求 請求項の数 8 O.L. (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願2002-22575(P2002-22575)

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所  
東京都千代田区霞が関1-3-1

(22) 出願日

平成14年1月30日 (2002.1.30)

(72) 発明者 山崎 登

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法  
人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72) 発明者 小島 周二

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法  
人産業技術総合研究所つくばセンター内

下ターム(参考) 4C076 AA19 AA95 CC27 EE45 EE50

(54) 【発明の名称】 標的指向性リポソーム

(57) 【要約】

【課題】 医薬品、化粧品をはじめ医学・薬学分野において応用し得る、癌などの標的細胞・組織を認識し局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療用のドラッグデリバリーシステムや診断用の細胞・組織センシングプローブとして利用できるリポソームを提供する。

【解決手段】 糖鎖をリンカー-蛋白質を介してリポソームに結合せしめた糖修飾リポソームにおいて、糖鎖の分子構造を種々変更することにより、標的細胞・組織の取り込みを選択的に制御しうるリポソームを構築し、治療用ドラッグデリバリーシステムあるいは診断用の細胞・組織センシングプローブとして有用なリポソームを提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリボソーム膜に結合しているものであって、糖鎖が、ルイスX型三糖鎖、シリアルルイスX型四糖鎖、3'-シリアルラクトサミン三糖鎖、6'-シリアルラクトサミン三糖鎖から選ばれたものであることを特徴とする糖鎖修飾リボソーム。

【請求項2】 リボソーム膜にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを結合せしめたものである請求項1記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項3】 リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである請求項1または2記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項4】 リンカー蛋白質が親水性化されたものである請求項1~3いずれか一項記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項5】 リボソーム膜にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンが結合せしめられたことを特徴とするリボソーム

【請求項6】 リボソーム膜に糖鎖がリンカー蛋白質を介して結合されているを特徴とする請求項5に記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項7】 糖鎖が、リンカー蛋白質を介してリボソーム膜に結合しているリボソームであって、リボソーム膜およびリンカー蛋白質のいずれもが親水性化していることを特徴とする糖鎖修飾リボソーム。

【請求項8】 請求項1~7いずれか一項記載のリボソームに薬剤を封入したリボソーム製剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、医薬品、化粧品をはじめ医学・薬学分野において応用し得る、癌などの標的細胞・組織を認識し局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療用のドラッグデリバリーシステムや診断用の細胞・組織センシングプローブとして利用できる糖鎖修飾リボソーム、および薬剤あるいは遺伝子等を封入したリボソーム製剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 米国の国家ナノテク戦略(NNI)によって実現を目指す具体的目標の一例として、「癌細胞や標的組織を狙い撃ちする薬物や遺伝子送達システム(DDS: ドラッグデリバリーシステム)」を掲げた。日本の総合科学技術会議のナノテクノロジー・材料分野推進戦略でも、重点領域として「医療用極小システム・材料・生物のメカニズムを活用し制御するナノバイオロジー」があり、その5年間の研究開発目標の1つとして「健康寿命延伸のための生体機能材料・ピンポイント治療等技術の基本シーズ確立」が掲げられている。一方、高齢化社会となるに伴い癌の発症率・死亡率は年々増えており、新規な治療材料である標的指向DDSの開発が

待望されている。その他の病気においても副作用のない標的指向DDSナノ材料の重要性が注目されており、その市場規模は近い将来に10兆円を超えると予測されている。また、これらの材料は治療とともに診断への利用においても期待されている。

【0003】 医薬品の治療効果は、薬物が特定の部位に到達し、そこで作用することにより発現される。その一方で、医薬品による副作用とは、薬物が不必要的部位に作用してしまうことである。従って、薬物を有効かつ安全に使用するためにもドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。の中でも特に標的指向(ターゲティング) DDSとは、薬物を「体内の必要な部位に」、「必要な量を」、「必要な時間だけ」送り込むといった概念である。そのための代表的な材料としての微粒子性キャリアであるリボソームが注目されている。この粒子に標的指向機能をもたせるために、リボソームの脂質の種類、組成比、粒子径、表面電荷を変化させるなどの受動的ターゲティング法が試みられているが、いまだ本法は不十分であり異なる改良が求められている。

【0004】 一方、高機能のターゲティングを可能にするために、能動的ターゲティング法も試みられている。これには「ミサイルドラッグ」ともよばれ理想的なターゲティング法であるが、国内外においてまだ完成されたものはなく今後の発展が大いに期待されているものである。本法は、リボソーム膜面上にリガンドを結合させ、標的組織の細胞膜面上に存在するレセプターに特異的に認識させることによって、積極的にターゲティング法を可能にさせる方法である。この能動的ターゲティング法での標的となる細胞膜面上に存在するレセプターのリガンドとしては、抗原、抗体、ペプチド、糖脂質や糖蛋白質などが考えられる。これらのうち、糖脂質や糖蛋白質の糖鎖は、生体組織の発生や形態形成、細胞の増殖や分化、生体防御や受精機構、癌化とその転移機構などの様々な細胞間コミュニケーションにおいて情報分子としての重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

【0005】 また、その標的となる各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクチン、シグレック、ガレクチンなどの各種のレクチン(糖鎖認識蛋白質)についての研究も進んできたことから、各種の分子構造を有する糖鎖は新しいDDSリガンドとして注目されてきている(①Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 43, 225-244. ②Yamazaki, I., N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>)。

【0006】 外膜表面にリガンドを結合したリボソームについては、癌などの標的部位に選択的に薬物や遺伝子

などを送達するためのDDS材料として多くの研究がなされてきた。しかしながら、それらは、生体外では標的細胞に結合するが、生体内では期待される標的細胞や組織にターゲティングされないものがほとんどである。(① Forssen, E. and Willis, M. (1998) *Adv. Drug Delivery Rev.* **29**, 249-271. ②高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167頁、医薬ジャーナル社、大阪)。糖鎖の分子認識機能を利用したDDS材料の研究開発においても、糖鎖を有する糖脂質を導入したリポソームについて若干の研究が知られているが、それらの機能評価は生体外(*in vitro*)によるもののみであり、糖鎖を有する糖蛋白質を導入したリポソームの研究はほとんど進んでいない。(③DeFreees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6101-6104. ④Spevak, W., Foza, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) *J. Med. Chem.* **39**, 1018-1020. ⑤Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) *Glycobiology* **8**, 311-319. ⑥Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S. (2001) Trends in Glyoscience and Glycotechnology **13**, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/TIPDF/yamazaki.pdf>)。したがって、糖脂質や糖蛋白質の多種多様な糖鎖を結合したリポソームについての調製法と生体内動態(*in vivo*)解析を含めた体系的な研究は、これまで未開発で今後の進展が期待される重要な課題である。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】そこで本発明の課題は、各種組織の細胞表面上に存在する各種のレクチン(糖鎖認識蛋白質)に対して特異的な結合活性を有する糖鎖を結合したリポソームであって、実際の生体内の細胞・組織を識別して薬剤あるいは遺伝子を効率的に輸送し得るリポソームを提供することにある。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために、本発明者等は、リポソーム表面の性質あるいは該表面に結合させると糖鎖およびリンカー蛋白質について種々の実験、検討を加え、糖鎖の構造により各組織への指向性を実際に制御できることに加え、リポソーム表面および/またはリンカー蛋白質を水と処理すれば、各組織に対するリポソームの移行量をさらに増大し得、これにより薬剤あるいは遺伝子を標的細胞・組織に効率的に輸送できることを見いだし、本発明を完成するに至ったものである。すなわち本発明は、以下の(1)～(8)に関するものである。

(1) 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、ルイX型三糖鎖、シアリルレイスX型四糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖から選ばれたものであることを特徴とする糖鎖修飾リポソーム。

(2) リポソーム膜にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを結合せしめたものである上記(1)に記載の糖鎖修飾リポソーム。

(3) リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである、上記(1)または(2)に記載の糖鎖修飾リポソーム。

(4) リンカー蛋白質が親水性化されたものである上記(1)～(3)いずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

(5) リポソーム膜にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンが結合せしめられたことを特徴とするリポソーム

(6) リポソーム膜に糖鎖がリンカー蛋白質を介して結合されているを特徴とする、上記(5)に記載の糖鎖修飾リポソーム。

(7) 糖鎖が、リンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合しているリポソームであって、リポソーム膜およびリンカー蛋白質のいずれもが親水性化されていることを特徴とする糖鎖修飾リポソーム。

(8) 上記(1)～(7)いずれかに記載のリポソームに薬剤を封入したリポソーム製剤。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明をさらに詳細に説明する。リポソームとは、通常、膜状に集合した脂質層および内部の水層から構成される閉鎖小胞を意味する。本発明のリポソームは、第1～第4図に示されるように、その表面すなわち脂質層に糖鎖が、ヒト血清アルブミンのようなリンカー蛋白質を介して、共有結合している。但し、第1～4図においては、糖鎖-蛋白質はリポソームに1つしか結合していない様に記載されているが、これら4図(第5図を含めて)は模式図であって、実際にには、糖鎖-リンカー蛋白質はリポソーム表面に多数結合している。糖鎖としては、例えば、第1図に示されるルイスX型三糖鎖(Gal. $\beta$ 1-4(Fuc. $\alpha$ 1-3)GalNAc $\beta$ )、第2図に示されるシアリルルイスX型四糖鎖(Neu5Ac. $\alpha$ 1-2 Gal. $\beta$ 1-4(Fuc. $\alpha$ 1-3)GalNAc)、第3図に示される3'-シアリルラクトサミン三糖鎖(Neu5Ac. $\alpha$ 1-2-3 Gal. $\beta$ 1-4GalNAc)、および第4図に示される6'-シアリルラクトサミン三糖鎖(Neu5Ac. $\alpha$ 1-2-6Gal. $\beta$ 1-4GalNAc)が挙げられ、リンカー蛋白質としては、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)等の動物の血清アルブミンが挙げられるが、特にヒト血清アルブミンを使用する場合は、各組織に対する取り込みが多いことがマウスについての実験により確かめられている。

【0010】本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、フォスマチジルコリン類、フォスマチジルエタノールアミン類、フォスマチジン酸類、ガングリオンド類または糖脂質類またはフォスマチジルグリセロール類、コレステロール等が挙げられ、フォスマ

アチジルコリン類としては、ジミリストイルフォスファチジルコリン、ジパレミトイルフォスファチジルコリン、ジステアロイルフォスファチジルコリン等が、また、フォスファチジルエタノールアミン類としては、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパレミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等が、フォスファチジン類としては、ジミリストイルフォスファチジン酸、ジステアロイルフォスファチジン酸、ジセチルリン酸等が、ガングリオシド類としては、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGA1、ガングリオシドGT1b等が、糖脂質類としては、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、フォスファチド、グロボシド等が、フォスファチジルグリセロール類としては、ジミリストイルフォスファチジルグリセロール、ジパレミトイルフォスファチジルグリセロール、ジステアロイルフォスファチジルグリセロール等が好ましい。

【0011】本発明において使用するリボソームは、通常のものでも使用できるが、その表面は親水性化されていることが望ましい。

【0012】リポソーム自体は、周知の方法に従い製造することができるが、これには、薄膜法、逆層蒸発法、エタノール注入法、脱水一再水和法等を挙げることができる。

〔0013〕また、超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモナイゼーション法等を用いて、リポソームの粒子径を調節することも可能である。本発明のリポソーム自体の製法について、具体的に述べると、例えば、まず、フォスファチジルコリン類、コレステロール、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類、ガングリオシド類または糖脂質類またはフォスファチジルグリセロール類を配合成分とする脂質と界面活性剤コール酸ナトリウムとの混合ミセルを調製する。

【0014】とりわけ、フォスファチジルエタノールアミン類の配合は親水性化反応部位として、ガングリオンド類または糖質類またはフォスファチジルグリセロール類の配合はリンカー蛋白質の結合部位として必須のものである。そして、これにより得られる混合ミセルの限外済過を行うことによりリポソームを作製する。統いて、リポソーム膜の脂質フォスファチジルエタノールアミン上に架橋用の2価試薬とトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンとを用いてリポソーム表面を親水性化する。

【0015】リボソームの親水性化は、従来公知の方法、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニアルコール、無水マレイン酸共重合体等を共有結合により結合させたリン脂質を用いてリボソームを作成する方法  
(特開2001-032626号)等も用いることができる。

可能ではあるが、本発明においては、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水化することが特に好ましい。

【0106】本発明のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを用いる手法は、ポリエチレングリコールなどを用いる従来の親水性化方法と比較していくつかの点で好ましい。例えば、本発明のように糖鎖をリボソーム上に結合してその分子認識機能を標的指向性に利用するものでは、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンは低分子量物質であるので従来のポリエチレングリコールなどの高分子量物質を用いる方法に比べて、糖鎖に対する立体障壁となりにくく標的細胞膜面上のレクチン(糖鎖認識蛋白質)による糖鎖分子認識反応の進行を妨げないの特徴好ましい。

【0017】また、本発明によるリボソームは該親水化処理後においても粒径分布や成分組成、分散特性が良好であり、長時間の保存性や生体内安定性も優れているのでリボソーム製剤化して利用するに好ましい。

〔0018〕トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化するには、例えばジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジガルミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質を用いて、常法により得たリポソーム溶液にビスフルオロスクシニミチルスベラート、ジスクシニミチルグルタルート、ジチオビススクシニミチルプロピオネート、ジスクシニミチルスベラート、3,3'-ジチオビスフルオロスクシニミチルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミチルスベラート、エチレングリコールビスフルオロスクシニミチルスベラート等の2価試薬を加えて反応させることにより、リポソーム膜上のジガルミリストイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質に2価試薬を結合させ、次いでトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを、該2価試薬の一方の結合手と反応させることにより、リポソーム表面にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを结合せしめる。

【0019】本発明においては、リポソームに、さらに、糖鎖をリンカー蛋白質を介して結合させるが、この手段としては、まず、リポソームを、 $\text{NaIO}_4$ 、 $\text{Pb}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$ 、 $\text{NaBiO}_3$ 等の酸化剤で処理して、リポソーム膜面に存在するガングリオンドを酸化し、次いで、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 、 $\text{NaBH}_4$ 等の試薬を用いて、リンカー蛋白質とリポソーム膜面上のガングリオシドを、還元的アミノ化反応により結合させる。このリンカー蛋白も、親水性化するのが好ましく、これにはリンカー蛋白質にヒドロキシ基を有する化合物を結合させるが、例えば、ビススルフォスクニミジルスペラート、ジスクシニミジルグルタレート、ジチオビスクシニミジルアロピオネート、ジスクシニミジルペラート、3,3'-ジチオビススルフォスクニミジルプロビオ

ネット、エチレングリコールビススクニミデルスクシネット、エチレングリコールビスルフォスクニミデルスクシネット等の2価試薬を用いて、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンをリポソーム上のリンカー蛋白質と結合させればよい。

【0020】これを具体的に述べると、まず、リンカー蛋白質の全てのアミノ基に架橋用2価試薬の一端を結合する。そして、各種糖鎖の還元末端をグリコシルアミノ化反応して得られる糖鎖グリコシルアミン化合物を調製し、この糖鎖のアミノ基とリポソーム上の上記で結合された架橋2価試薬の一部分の他の未反応末端とを結合する。

【0021】次に、このようにして得られる糖鎖結合リポソーム膜面上蛋白質の表面に糖鎖が結合していない未反応で残っている大部分の2価試薬未反応末端を用いて親水性化処理を行う。つまり、このリポソーム上蛋白質に結合している2価試薬の未反応末端とトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンとの結合反応を行い、リポソーム表面を親水性化することにより本発明のリポソームを得ることができる。

【0022】リポソーム表面およびリンカー蛋白質の親水性化は、各種組織への移行性、および血中における滞留性および各種組織への移行性を向上させる。これは、リポソーム表面およびリンカー蛋白質表面が親水性化されることによって、糖鎖以外の部分が、各組織等においてはあたかも生体内水分であるかのようにみえ、これにより、標的以外の組織等に認識されず、糖鎖のみがその標的組織のレクチン(糖鎖認識蛋白質)により認識されることに起因するものと思われる。

【0023】本発明においては、糖鎖は、リポソーム上のリンカー蛋白質に結合させるが、これには、糖鎖を構成する糖類の還元末端を、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{NH}_2\text{COONa}_4$ 等のアノミヤウム塩を用いてグリコシルアミノ化し、次いで、ビスルフォスクニミデルスベラート、ジスクニミデルグルタレート、ジチオビスクニミデルプロピオネット、ジスクニミデルスベラート、3,3'-ジチオビスルフォスクニミデルプロピオネット、エチレングリコールビススクニミデルスクシネット、エチレングリコールビスルフォスクニミデルスクシネット等の2価試薬を用いて、リポソーム膜面上に結合したリンカー蛋白質と、上記グリコシルアミノ化された糖類とを結合させ、図1~4に示されるようなリポソームを得る。なお、これらの糖鎖は市販されている。

【0024】本発明においては、使用する糖鎖の構造を種々選択することにより、各標的細胞、組織に対する指向性を制御することができる。例えば、実施例における図6~13においては、図1~図4に示されるルイスX型三糖鎖、シリアルルイスX型四糖鎖、3'-シリアルラクトサミン三糖鎖、6'-シリアルラクトサミン三糖鎖の

4種の糖鎖修飾リポソーム(LX, SLX, 3SLN, 6SLN)は、ガン組織、炎症組織に対して全般的に指向性が高いが、シリアルルイスX型四糖鎖修飾リポソーム(SLX)は、特にリンパ節、脳、肝臓、脾臓に、3'-シリアルラクトサミン三糖鎖修飾リポソーム(3SLN)はガン組織、脳、血中に、6'-シリアルラクトサミン三糖鎖修飾リポソーム(6SLN)は、肺、血中に対する指向性がそれぞれ特に高い。

【0025】したがって、本発明のリポソームに、治療あるいは診断に供する薬剤あるいは遺伝子を封入することによって得られるリポソーム製剤は、ガン組織、炎症組織、各種組織への移行性が選択的に制御されたものであり、治療薬あるいは診断剤の標的細胞、組織への集中による効力の増強あるいは他の細胞、組織に対する薬剤の取り込みの減少による副作用の緩和等を図れるものである。

【0026】リポソームへ薬剤等を封入するには、周知の方法を用いればよく、例えば、薬剤等の含有溶液とフォスマチルコリン類、フォスマチルエタノールアミン類の脂質を用いてリポソームを形成することにより、薬剤等はリポソーム内に封入される。以下、本発明の実施例を示すが本発明は特にこれらにより限定されるものではない。

## 【0027】

### 【実施例1】リポソームの調製

リポソームは既報の手法(Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* **242**, 56-65)により、改良型コール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジハルミトイフルフォスマチルコリン、コレステロール、ジセチルfosfate、ガングリオシド及びジハルミトイフルフォスマチルエタノールアミンをモル比でそれぞれ35:40:5:15:5の割合の合計脂質量45.6mgにコール酸ナトリウムを4.9mg添加し、クロロホルム/メタノール溶液3mlに溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜をTAPS緩衝液(pH 8.4)3mLに懸滴、超音波処理して、透明なミセル懸滴を得た。さらに、ミセル懸滴液をPM10膜(Amicon Co., USA)とPBS緩衝液(pH 7.2)を用いた限外済過にかけ均一リポソーム(平均粒径100nm)10mlを調製した。

## 【0028】

### 【実施例2】リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例1で調製したリポソーム溶液10mlをXM300膜(Amicon Co., USA)とCBS緩衝液(pH 8.5)を用いた限外済過にかけ溶液のpHを8.5にした。次に、架橋試薬bis(sulfosuccinimidyl)suberate(BS<sup>2</sup>; Pierce Co., USA)10mMを加え、25°Cで2時間攪拌した。その後、更に7°Cで一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジハルミトイフルフォスマチルエタノールアミンとBS<sup>2</sup>との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液をXM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)を用いた限外済過にかけ均一リポソーム(平均粒径100nm)10mlを得た。

H 8.5)で限外済過にかけた。次に、CBS緩衝液(pH 8.5)1 mlに溶かしたtris(hydroxymethyl)aminomethane 40mgをリボソーム液10mlに加えて、25°Cで2時間攪拌後、7°Cで一晩攪拌してリボソーム膜上の脂質に結合したBS<sup>9</sup>とtris(hydroxymethyl)aminomethaneとの化学結合反応を完結した。これにより、リボソーム膜の脂質ジパレミトイロフォスファチジルエクノールアミン上にtris(hydroxymethyl)aminomethaneの水酸基が配位して水和性化された。

### 【0029】

#### 【実施例3】リボソーム膜面上へのヒト血清アルブミン(HSA)の結合

既報の手法(Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65)により、カッティング反応法を用いて調製した。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずははじめに、10mlのリボソーム膜面上に存在するガングリオシドを1mlのTAPS緩衝液(pH 8.4)に溶かしたメタヨウ素酸ナトリウム43mgを加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸化した後、XMB00膜とPBS緩衝液(pH 8.0)で限外済過することにより酸化されたリボソーム10mlを得た。このリボソーム液に、20mgのヒト血清アルブミン(HSA)を加えて25°Cで2時間攪拌し、次にPBS(pH 8.0)に2M NaBH<sub>4</sub> CN 100μlを加えて10°Cで一晩攪拌してリボソーム上のガングリオシドとHSAとのカッティング反応でHSAを結合した。そして、XMB00膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外済過をした後、HSA結合リボソーム液10mlを得た。

### 【0030】

#### 【実施例4】リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのルイスX型三糖鎖の結合

ルイスX型三糖鎖(Calbiochem Co., USA)50μgを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37°Cで3時間攪拌した後、0.45μlのフィルターで済過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してルイスX型三糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを得た。次に、(実施例3)で得たリボソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)(DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25°Cで2時間、続いて7°Cで一晩攪拌し、XMB00膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外済過してDTSSPがリボソーム上のHSAに結合したリボソーム1mlを得た。次に、このリボソーム液に上記のルイスX型三糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを加えて、25°Cで2時間攪拌し、その後7°Cで一晩攪拌し、XMB00膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外済過してリボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに3'-アシリアルラクトサミン三糖鎖の結合を行った。その結果、図4で示されるルイスX型三糖鎖とヒト血清アルブミンとリボソームとが結合したリボソーム(略称:LX) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm)が得られた。

### 【0031】

【実施例5】リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのシアリルルイスX型四糖鎖の結合  
シアリルルイスX型四糖鎖(Calbiochem Co., USA)50μgを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37°Cで3日間攪拌した後、0.45μlのフィルターで済過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してシアリルルイスX型四糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを得た。次に、(実施例3)で得たリボソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)(DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25°Cで2時間、続いて7°Cで一晩攪拌し、XMB00膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外済過してリボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにシアリルルイスX型四糖鎖の結合を行った。その結果、図2で示されるシアリルルイスX型四糖鎖とヒト血清アルブミンとリボソームとが結合したリボソーム(略称:SLX) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm)が得られた。

### 【0032】

【実施例6】リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上への3'-アシリアルラクトサミン三糖鎖の結合  
3'-アシリアルラクトサミン三糖鎖(Seikagakukogyo Co., Japan)50μgを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37°Cで3日間攪拌した後、0.45μlのフィルターで済過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して3'-アシリアルラクトサミン三糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを得た。次に、(実施例3)で得たリボソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)(DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25°Cで2時間、続いて7°Cで一晩攪拌し、XMB00膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外済過してDTSSPがリボソーム上のHSAに結合したリボソーム1mlを得た。次に、このリボソーム液に上記の3'-アシリアルラクトサミン三糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを加えて、25°Cで2時間攪拌し、その後7°Cで一晩攪拌し、XMB00膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外済過してリボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに3'-アシリアルラクトサミン三糖鎖の結合を行った。その結果、図3で示される3'-アシリアルラクトサミンヒト血清アルブミンとリボソームとが結合したリボソーム(略称:3SLN) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm)が得られた。

### 【0033】

【実施例7】リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上への6'-アシリアルラクトサミン三糖鎖の結合  
6'-アシリアルラクトサミン三糖鎖(Seikagakukogyo Co., Japan)50μgを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37°Cで3日間攪拌した後、0.45μlのフィルターで済過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して6'-アシリアルラクトサミン三糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを得た。次に、(実施例3)で得たリボソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)(DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25°Cで2時間、続いて7°Cで一晩攪拌し、XMB00膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外済過してDTSSPがリボソーム上のHSAに結合したリボソーム1mlを得た。次に、このリボソーム液に上記の6'-アシリアルラクトサミン三糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを加えて、25°Cで2時間攪拌し、その後7°Cで一晩攪拌し、XMB00膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外済過してリボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに6'-アシリアルラクトサミン三糖鎖の結合を行った。その結果、図4で示される6'-アシリアルラクトサミンヒト血清アルブミンとリボソームとが結合したリボソーム(略称:6SLN) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm)が得られた。

液に加え、37°Cで3日間攪拌した後、0.45μmのフィルターで沪過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して6'-シアリラクトサミン三糖鎖のグリコシリアルアミン化合物50μgを得た。次に、実施例3で得たリボソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)(DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25°Cで2時間、続いて7°Cで一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外沪過してDTSSPがリボソーム上のHSAに結合したリボソーム1mlを得た。次に、このリボソーム液に上記の6'-シアリラクトサミン三糖鎖のグリコシリアルアミン化合物50μgを加えて、25°Cで2時間攪拌し、その後7°Cで一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外沪過してリボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに6'-シアリラクトサミン三糖鎖の結合を行った。その結果、図4で示される6'-シアリラクトサミンヒト血清アルブミンとリボソームが結合したリボソーム(略称: 6SLN)2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm)が得られた。

## 【0034】

【実施例8】リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合比較試料としてのリボソームを調製するために、実施例3で得たリボソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)(DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25°Cで2時間、続いて7°Cで一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外沪過してDTSSPがリボソーム上のHSAに結合したリボソーム1mlを得た。次に、このリボソーム液にtris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan)13mgを加えて、25°Cで2時間攪拌し、その後7°Cで一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外沪過してリボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合を行った。その結果、図5で示されるtris(hydroxymethyl)aminomethaneヒト血清アルブミンとリボソームが結合した比較試料としてのリボソーム(略称: TRIS)2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm)が得られた。

## 【0035】

表1： 各種の糖鎖結合リボソーム複合体がレクチン結合活性阻害効果を示す実験結果

リボソーム 複合体	リボソーム複合体の各濃度(μg蛋白質/g)			における遮光効果(吸光度)	
	0.01 μg	0.05 μg	0.11 μg	0.33 μg	1 μg
LX	0.199	0.195	0.195	0.195	0.126
SLX	0.105	0.100	0.100	0.064	0.073
3SLN	0.175	0.158	0.144	0.151	0.095
6SLN	0.256	0.245	0.233	0.209	0.151

## 【0037】

【実施例11】クロラミンT法による各種糖鎖結合リボソームの<sup>125</sup>I標識

クロラミンT(Wako Pure Chemical Co., Japan)溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ3mg/ml並びに5mg/mlとなるように用事調製して用いた。(実施例

【実施例9】リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上の親水性化処理

実施例4~7において調製された4種類の糖鎖が結合したリボソームについて、それぞれ別々に以下の手順によりリボソーム上のHSA蛋白質表面の水和性化処理を行った。4種の糖鎖結合リボソーム2mlに、別々に、tris(hydroxymethyl)aminomethane 13mgを加えて、25°Cで2時間、その後7°Cで一晩攪拌した後、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外沪過し未反応物を除去して、最終産物である水和性化処理された4種類の糖鎖結合リボソーム複合体(略称: LX, SLX, 3SLN, 6SLN)を各2mlを得た。

## 【0036】

【実施例10】各種の糖鎖結合リボソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例4~7および実施例9で調製した4種の糖鎖結合リボソーム複合体のin vitroでのレクチン結合活性は、常法(Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505)に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン(E-selectin; R&D Systems Co., USA)を96穴マイクロプレートに固定化した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したコシル化フェチュイン0.1μgとともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リボソーム複合体(蛋白質量として、0.01μg, 0.04μg, 0.11μg, 0.3μg, 1μg)を加え、4°Cで2時間インキュベートした。PBS(pH 7.2)で3回洗浄した後、horseradish peroxidase(HRP)結合ストレプトアビシンを添加し、さらに4°Cで1時間インキュベート、PBS(pH 7.2)で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加して室温で静置、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corp., USA)で測定した。コシル化フェチュインのビオチン化は sulfo-NHS-biotin reagent(Pierce Co., USA)処理後、Centrificon-30(Amicon Co., USA)により精製した。HRP結合ストレプトアビシンは、HRPの酸化とNaBH<sub>4</sub>ONを用いた還元アミノ化法によるストレプトアビシンの結合により調製した。この測定結果を表1に示す。

## 【表1】

4)から(実施例9)により調製した4種の糖鎖結合リボソーム並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リボソームとを50μlずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて<sup>125</sup>I-NaI(NEN Life Science Product, Inc. USA)を15μl、クロラミンT溶液を10μl加え反応させた。5分ごとにクロラミンT溶液10μlを加え、この操作

を2回繰り返した後15分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム $100\mu\text{l}$ 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech, Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBSで溶出、標識体を精製した。最後に、非標識リポソーム複合体を添加して比活性 ( $4 \times 10^6 \text{ Ba/mg protein}$ ) を調整して5種類の $^{125}\text{I}$ 標識リポソーム液を得た。

### 【0038】

【実施例12】各種の糖鎖結合リポソーム複合体の担癌マウスでの各組織への分布量の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約 $2 \times 10^7$  個) を雄性ddYマウス (7週齢) 大腿部皮下に移植し、癌組織が $0.3\text{--}0.6\text{ g}$  に発育 (6-8日後) したものと本実験に用いた。この担癌マウスに (実施例1) により $^{125}\text{I}$ 標識した4種の糖鎖並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リポソーム複合体 $0.2\text{ml}$ を蛋白質量として $3\mu\text{g}/\text{匹}$ の割合となるように尾静脈に注入投与し、60分後に組織 (血液、肝臓、脾臓、肺、脳、癌組織、癌の周囲の炎症組織、リンパ節) を摘出、各組織の放射能をガムマカウンタ (Aloka ARC 300) で測定した。なお、各組織への放射能分布量は、投与全放射能に対する各組織 $1\text{g}$ 当たりの放射能の割合 (%投与量/ $\text{g}$ 組織) で表示した。この結果を図6-図13に示す。

### 【0039】

【発明の効果】上記実施例13に示したように、ルイスX型三糖鎖とヒト血清アルブミン (リンカー) とリポソームとが結合したリポソーム、シリアルルイスX型四糖鎖とヒト血清アルブミン (リンカー) とリポソームとが結合したリポソーム、3'-シリアルラクトサミン三糖鎖とヒト血清アルブミン (リンカー) とリポソームとが結合したリポソーム、6'-シリアルラクトサミン三糖鎖とヒト血清アルブミン (リンカー) とリポソームとが結合したリポソームを作製し、マウスでの各種組織への体内動態、特に癌組織への取込みについてエールリッヒ固形癌担癌マウスを用いて解析した結果、糖鎖の分子構造の差を利用することによって、実際の生体においてリポソーム

の各種組織への体内動態を促進あるいは抑制して制御することができ、これに基づく効率の良い癌組織をはじめとする目的組織 (血中、肝臓、脾臓、肺、脳、癌組織、炎症組織、リンパ節) へのターゲティング機能をDLS材料に付与することができる事が明らかとなつた。このように、本発明により、医学・薬学分野において極めて有用な、標的指向性を制御し得るリポソームを提供することができた。

### 【図面の簡単な説明】

【図1】はルイスX型三糖鎖を結合したリポソームの模式図である。

【図2】シリアルルイスX型四糖鎖を結合したリポソームの模式図である。

【図3】は3'-シリアルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの模式図である。

【図4】は6'-シリアルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの模式図である。

【図5】は比較試料としてのtris(hydroxymethyl)aminomethaneを結合したリポソームの模式図である。

【図6】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の血中の分布量を示す図である。

【図7】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肝臓への分布量を示す図である。

【図8】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の脾臓への分布量を示す図である。

【図9】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肺への分布量を示す図である。

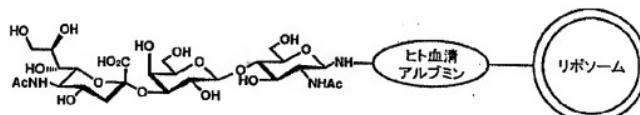
【図10】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の脳への分布量を示す図である。

【図11】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の癌組織への分布量を示す図である。

【図12】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の炎症組織への分布量を示す図である。

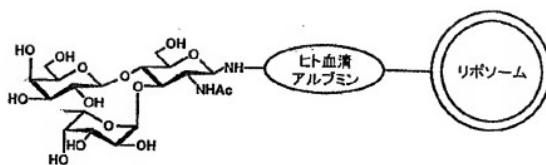
【図13】は5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後のリンパ節への分布量を示す図である。

【図3】



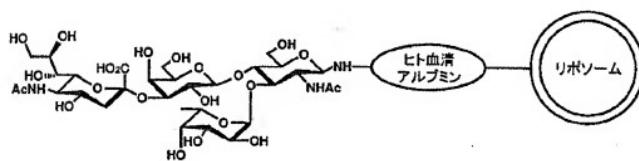
【図3】3'-シリアルラクトサミン三糖鎖を結合した標的指向制御性リポソームの模式図

【図1】



【図1】ルイスX型三糖鎖を結合した様の指向制御性リポソームの模式図

【図2】



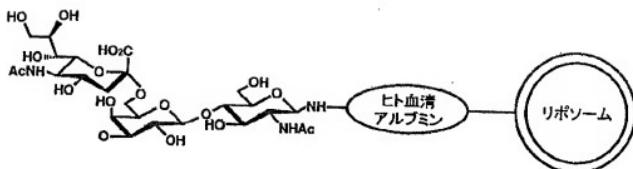
【図2】シアリルルイスX型四糖鎖を結合した様の指向制御性リポソームの模式図

【図5】



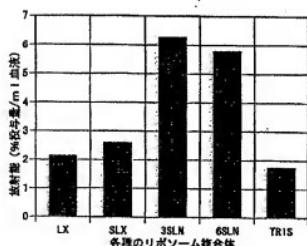
【図5】比較試料としてのtris(hydroxymethyl)aminomethaneを結合したリポソームの模式図

【図4】



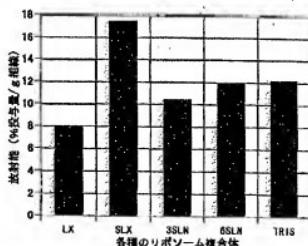
【図4】6'-シリルラクトサミン三糖鎖を結合した標的指向制御性リポソームの模式図

【図6】



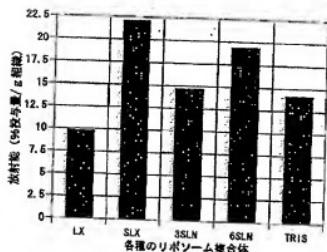
【図6】5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の血中への分布量

【図7】



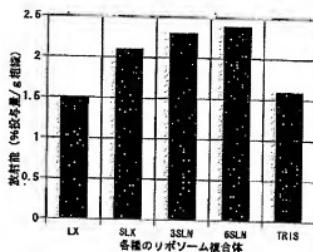
【図7】5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肝臓への分布量

【図8】



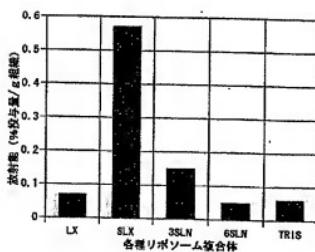
【図8】5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肝への分布量

【図9】



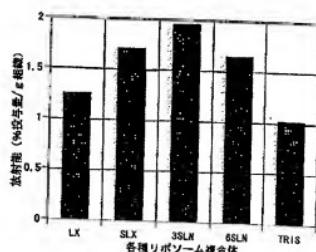
【図9】5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肺への分布量

【図10】



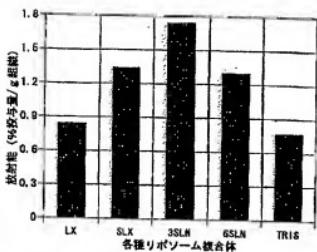
【図10】5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の腎への分布量

【図11】



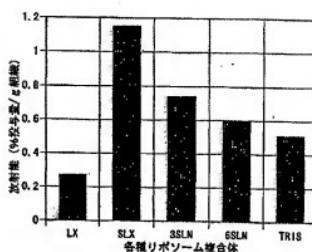
【図11】5種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の心臓への分布量

【図12】



【図12】各種のリポソーム複合体の肺部内投与60分後の肺組織への分布量

【図13】



【図13】各種のリポソーム複合体の肺部内投与60分後のリンパ節への分布量